

Rhizopus 属糸状菌を用いた発酵大豆の開発とその機能性

亀田 剛旨*・青木 秀之

大豆発酵食品は、アジアを中心に世界各国に存在している。東南アジアの代表的な大豆発酵食品の一つとして、インドネシアのジャワ島を起源とする「テンペ」が知られている。日本の納豆は、煮豆に *Bacillus* 属の納豆菌を生育させた大豆発酵食品であるが、テンペは、煮豆に糸状菌の一種である *Rhizopus* 属のテンペ菌を生育させた大豆発酵食品であることから「インドネシアの納豆」とも呼ばれている。

テンペについては、2013年に食品の国際規格であるコーデックスが制定された(CODEX STAN 313R-2013)¹⁾。それによると、テンペの発酵菌株としては、*Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* (以下、*R. oligosporus*)、*Rhizopus oryzae*、*Rhizopus stolonifer*のいずれかを使用することが定められている。しかしながら、これまでテンペ製造の多くは、スターターとして *R. oligosporus* もしくは *R. oryzae* を使用しており、これまでの研究についても、これらの菌株を用いたテンペに関するものがほとんどであった。一方で、*R. stolonifer* の利用は非常に限られており、この菌株を用いたテンペの機能性に関しても注目されていなかった。

そこで筆者らは、テンペの製法をもとに3種の *Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆について種々検討を行い、 γ -アミノ酪酸 (GABA) やイソフラボンアグリコンなどの機能性成分を高含有する発酵大豆を開発した。その機能性を評価した結果、いくつかの興味深い研究結果が確認されたので、本稿で紹介する。

大豆発酵食品「テンペ」について

インドネシアでのテンペの伝統的な製法は、大豆を浸漬後、脱皮機などにて脱皮を行い、再度、一晚浸漬後、蒸煮を行い水切り冷却し、蒸煮大豆を作る。蒸煮大豆に *R. oligosporus* を主に含むテンペスターターを混合し、通気用の小さな穴の開いた袋やトレーに充填後、発酵棚に並べて室温で一日半から二日ほど発酵させることにより、カビの菌糸で覆われた真っ白な塊のテンペが作られる(図1)。

テンペの発酵が進むにつれて、アラニン、ロイシンなどの遊離アミノ酸、オレイン酸、リノール酸などの遊離脂肪酸、ビタミンB₂、ビタミンB₆、パントテン酸といっ



図1. テンペ

たビタミン類が原料の大豆と比較し増加する。また、テンペは抗酸化能が高いことも知られている。テンペ粉末と未発酵の大豆粉末について、脂質劣化の指標である過酸化脂質の変化を調べた結果、未発酵の大豆粉末では経時的に過酸化物質価が上昇するのに対し、テンペ粉末は過酸化物質価の上昇が抑えられ、高い抗酸化能を有することが認められている²⁾。

γ -アミノ酪酸を高含有する発酵大豆の開発

γ -アミノ酪酸 (GABA) は、非タンパク質構成アミノ酸の一種であり、哺乳動物の中樞神経系では抑制性の神経伝達物質であることが報告されている。近年では、血圧上昇抑制効果やリラックス効果があることで注目されている。テンペにおいてGABAが産生されているか調べたところ、*R. oligosporus* で調製したテンペにおいてGABAが産生されていた。そこでさらにテンペ中のGABA含量を高める検討を行った結果、好気条件下で十分に発酵させた後、酸素濃度を低下させた嫌気条件下におくことで、GABA含量が顕著に高まることを見いだした。*R. oligosporus* による好気発酵のみでは、GABA含量が乾燥重量あたり約30 mg/100 gであったものが、酸素濃度を低下させた嫌気条件下にさらに5時間おくことで、GABA含量が約370 mg/100 gまで高まった。各種 *Rhizopus* 属糸状菌で同様に嫌気条件下におくことでGABA含量を高めることができるか確認した結果、すべての *R. oligosporus* と *R. oryzae* でGABA含量が顕著に高まり、特に *R. oligosporus* NBRC 32002やNBRC 32003では、GABA含量が乾燥重量あたり1,500 mg/100 g以上となった(表1)。

表1. 各種 *Rhizopus* 属の γ -アミノ酪酸の産生

Strains	GABA content
<i>Rhizopus oligosporus</i> NBRC 8631	720
<i>Rhizopus oligosporus</i> NBRC 31987	810
<i>Rhizopus oligosporus</i> NBRC 32002	1740
<i>Rhizopus oligosporus</i> NBRC 32003	1500
<i>Rhizopus oryzae</i> NBRC 4705	770
<i>Rhizopus oryzae</i> NBRC 5438	770
<i>Rhizopus oryzae</i> NBRC 5780	420
<i>Rhizopus oryzae</i> NBRC 9364	620

GABA content; mg/100 g dry weight

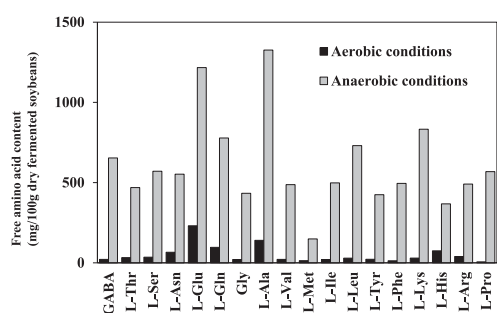


図2. 嫌気条件下での遊離アミノ酸の変化

さらに好気条件での発酵のみでは、総遊離アミノ酸は発酵大豆の乾燥重量あたり約1%しか産生されないが、嫌気条件下におくことでアラニンなどの遊離アミノ酸が顕著に増加し、総遊離アミノ酸が約11%まで増加することが認められた(図2)³⁾。

γ -アミノ酪酸を高含有する発酵大豆の機能性

GABAを高含有する発酵大豆(以下、GABA高含有発酵大豆)について、自然発症性高血圧ラットを用いて血圧上昇抑制効果を調べた。標準飼料であるAIN-76をベースとし、*R. oligosporus*で調製したGABA高含有発酵大豆粉末を0.1%および0.5%含む飼料にて2か月間飼育した。また、ポジティブコントロール群として、0.1% GABA高含有発酵大豆粉末と同等量である0.001% GABA標品を含む飼料で飼育した。その結果、GABA標品と同様にGABA高含有発酵大豆群において、GABA無添加のコントロール群と比較して、血圧上昇抑制効果が認められた(図3)⁴⁾。しかし、GABA高含有発酵大豆の添加量を増やしても、さらなる血圧上昇抑制効果は認められなかった。

また、血清の尿素窒素の値が、GABA無添加のコン

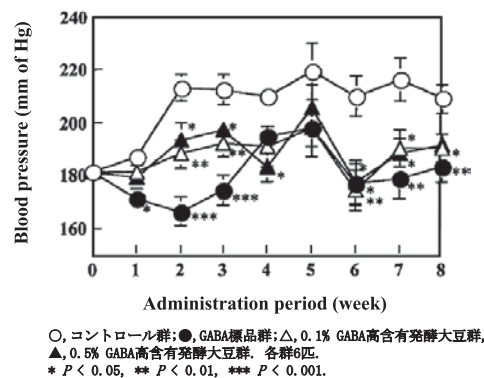


図3. GABA高含有発酵大豆の自然発症性高血圧ラットに対する血圧上昇抑制改善効果。値は平均±標準誤差を示す。

トロール群と比較してGABA標品と同様にGABA高含有発酵大豆群において低値となった。このことは、高血圧により引き起こされる腎機能の損傷をGABA高含有発酵大豆が保護していることが考えられた⁴⁾。

このようにGABA高含有発酵大豆において血圧上昇抑制効果が認められたが、ラットを用いた動物試験において、脂質代謝の改善効果⁵⁾やカルシウム吸収促進効果⁶⁾も認められている。

イソフラボンアグリコンを高含有する発酵大豆の開発

イソフラボンは、抗酸化、抗がん、抗糖尿などさまざまな機能性を有することが報告されているフラボノイド化合物である。大豆イソフラボンは、基本骨格を有するアグリコンのダイゼイン、ゲニステイン、グリシテインおよびそれらの種々の配糖体からなるが、生大豆中では、イソフラボンの多くはマロニル型配糖体および β -グルコシド配糖体の形で存在している。これら配糖体は食品加工の過程により、アグリコンへと変化することが報告されているが、特に発酵大豆においては、発酵中の微生物由来酵素の作用により、アグリコン化が促進されやすい。アグリコンは配糖体と比較して腸管からの吸収性が高く、さらにアグリコンの一種であるダイゼインは腸内細菌叢の代謝により、生理活性のより高いエクオールに変換されることも報告されている。筆者らは、コーデックスで定められた3種の*Rhizopus*属糸状菌を用いて調製した発酵大豆について、イソフラボン組成を分析した。その結果、すべての発酵大豆において、非発酵の蒸煮大豆と比較して、アグリコン含量が増加した(図4)。特に*R. stolonifer*を用いた発酵大豆は、乾燥重量あたり11 mg/100 gから81 mg/100 gにアグリコン含量が増加し、他の種を用いた発酵大豆と比較して、アグリコン含量が顕著に高いことがわかった⁷⁾。

発酵温度の影響を評価したところ、菌種によりアグリコン含量がもっとも高くなる最適発酵温度は異なり、*R. oligosporus*では37°C、*R. oryzae*では25°C、*R. stolonifer*では32°Cであった。発酵大豆中のイソフラボン組成の違いの要因を明らかにするために、イソフラボン配糖体からアグリコンの生成に関与するβ-グルコシダーゼ活性を測定したところ、イソフラボン組成の結果から予想された結果に反して、*R. oryzae*を用いた発酵大豆のβ-グルコシダーゼ活性がもっとも高かった。β-グルコシダーゼ活性の強弱とアグリコン含量の結果が異なった要因として、酵素活性測定条件が発酵中の条件と異なること

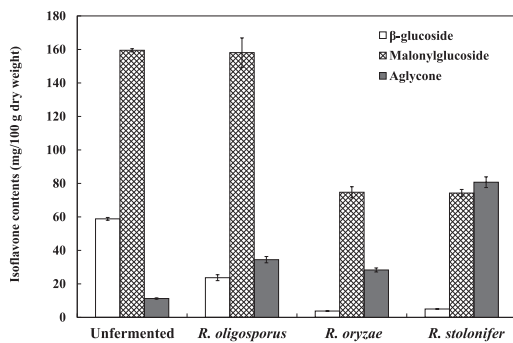


図4. 各種*Rhizopus*属菌の発酵大豆のイソフラボン含量。値は平均±標準偏差 (n=3) を示す。

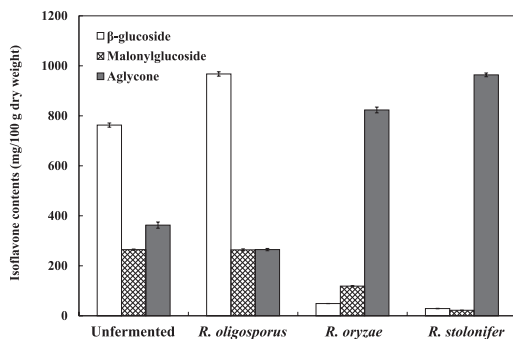


図5. 各種*Rhizopus*属菌の発酵大豆胚軸のイソフラボン含量。値は平均±標準偏差 (n=3) を示す。

が考えられた。また、アグリコンの生成にβ-グルコシダーゼ以外の酵素が関与している可能性も考えられた。

さらに、大豆中でイソフラボン含量の高い部位である大豆胚軸を使用することにより、イソフラボン含量の高い発酵大豆胚軸の調製が可能か検討した。3種の*Rhizopus*属糸状菌により大豆胚軸の発酵を行い、調製した発酵大豆胚軸中のイソフラボン組成を分析した。その結果、総アグリコン含量は、*R. stolonifer* > *R. oryzae* > *R. oligosporus*の順で増加していた(図5)。特に*R. stolonifer*を用いた発酵大豆胚軸では、総アグリコン含量が乾燥重量あたり964 mg/100 g (総イソフラボン中に占める総アグリコンの比率は95%)にまで高まり、アグリコン含量が顕著に高いことがわかった⁷⁾。

イソフラボンアグリコンを高含有する発酵大豆の機能性

3種の*Rhizopus*属糸状菌を用いた発酵大豆の摂取効果を明らかにするために、高脂肪食摂取ラットを用いた動物試験を実施した。試験食は牛脂を30%含むコントロール食群およびコントロール食に*R. oligosporus*、*R. oryzae*および*R. stolonifer*を用いて調製した発酵大豆粉末をそれぞれ20%ずつ配合した(それぞれ、RM群、RO群およびRS群とした)計4群とし、これら試料において21日間飼育した(各群10匹)。飼育完了後、血清中の肝障害関連パラメーターを測定した結果、RO群において、アンモニアのみが有意に減少したことを除き、RM群とRO群はコントロール群と比較して、AST、ALT、γ-GTP、総ビリルビン、アンモニアおよびLDHへの影響は認められなかった。一方、RS群においては、コントロール群と比較して、AST (-21%)、総ビリルビン (-50%) およびアンモニア (-13%) が有意に減少した。さらにALT (-12%) とLDH (-28%) については、減少傾向が確認された(表2)⁸⁾。

また、すべての発酵大豆摂取群において、肝臓の重量、トリグリセリド、脂質過酸化物質に変化は認められなかったが、総コレステロールは有意に減少した。さらに興味

表2. 血清関連パラメーターに対する各種発酵大豆の影響

	Control	RM	RO	RS
AST (IU/L)	132 ± 7 ^a	136 ± 7 ^a	125 ± 7 ^{ab}	104 ± 5 ^b
ALT (IU/L)	41 ± 1 ^{ab}	43 ± 1 ^a	40 ± 2 ^{ab}	36 ± 1 ^b
Total bilirubin (μmol/L)	2.4 ± 0.2 ^a	2.4 ± 0.2 ^a	2.1 ± 0.2 ^{ab}	1.2 ± 0.3 ^b
Ammonium (μmol/L)	206 ± 5 ^a	189 ± 4 ^{ab}	183 ± 6 ^b	179 ± 4 ^b
LDH (IU/L)	543 ± 42 ^{ab}	615 ± 53 ^a	531 ± 34 ^{ab}	393 ± 28 ^b

値は平均±標準誤差 (n=9-10)、異なるアルファベットは有意差 (P<0.05) を示す。

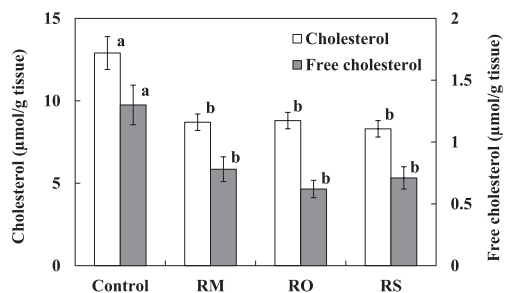


図6. 肝臓中のコレステロールに対する各種発酵大豆の影響. 値は平均±標準誤差 (n=8-10), 異なるアルファベットは有意差 (P<0.05) を示す.

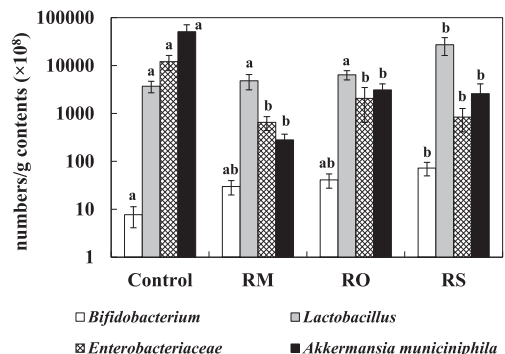


図7. 腸内細菌数に対する各種発酵大豆の影響. 値は平均±標準誤差 (n=10), 異なるアルファベットは有意差 (P < 0.05) を示す.

深いことに、すべての発酵大豆摂取群において、遊離コレステロールはより顕著に減少 (RM群, RO群およびRS群, それぞれ-40%, -45%および-45%) していた (図6)⁸⁾. 肝臓中の遊離コレステロールは非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) を引き起こす要因の一つとなりうる事が報告されている. したがって, RS群において, AST, 総ビリルビン, アンモニアなどの肝障害に関連する血清マーカーが減少した要因の一つとして, 肝臓中の遊離コレステロールが減少したことが考えられた.

さらに, 前述の肝機能改善効果が確認された飼育条件と同様の条件にて高脂肪食摂取ラットを用いた動物試験を実施し, 腸内菌叢に与える影響について評価した.

その結果, RS群において, *Bifidobacterium* (対コントロール群9.4倍)や*Lactobacillus* (対コントロール群7.4倍) が顕著に増加していたのに対して, RM群とRO群では有意差は確認されなかった. またすべてのテンペ摂取群において, *Enterobacteriaceae*が顕著に減少し, RM群とRS群では, *Akkermansia muciniphila*も有意に減少していた (図7)⁹⁾. 腸内中の有機酸を測定した結果, 3種の*Rhizopus*属糸状菌を用いて調製した発酵大豆のすべてにおいて, プロピオン酸と酢酸の増加が認められ

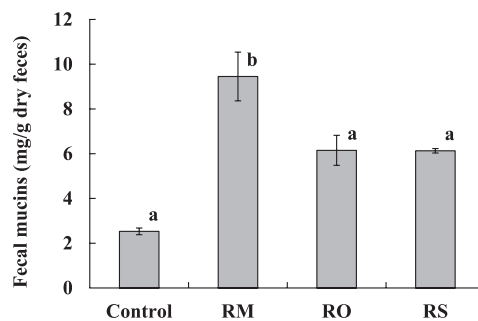


図8. 糞中のムチンに対する各種発酵大豆の影響. 値は平均±標準誤差 (n=10), 異なるアルファベットは有意差 (P < 0.05) を示す.

た. また, ムチンは, RM群において顕著に増加したが, RO群およびRS群では, 顕著な増加は認められなかった (図8)⁹⁾.

以上のように, RS群では, *Bifidobacterium*や*Lactobacillus*を顕著に増加し, 一方, RM群では, ムチンを顕著に増加させるなど, 個々の*Rhizopus*属糸状菌の発酵大豆により, 腸内環境改善効果が異なることが分かった. 今後, *Rhizopus*属糸状菌の発酵大豆のどのような成分が, 肝機能改善効果および腸内環境改善効果に寄与しているか明らかにする必要がある.

最後に

本稿では, テンペの製法をもとに*Rhizopus*属糸状菌を用いたGABAやイソフラボンアグリコンを高含有する発酵大豆の開発とその機能性として, 血圧上昇抑制効果, 肝機能改善効果, 腸内環境改善効果について紹介した. *Rhizopus*属糸状菌を用いた発酵大豆には, まだまだ未知なる機能があると思われ, 今後の研究の進展により, さらにさまざまな機能性の解明が期待される. それらの研究結果より, 私達の健康維持に役立つ機能性食品の素材になると思われる.

文 献

- 1) Codex Alimentarius. (2013). Regional Standard for Tempe (CODEX STAN 313R-2013).
- 2) 青木秀之: 生物工学, **86**, 186 (2008).
- 3) Aoki, H. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1018 (2003).
- 4) Aoki, H. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1806 (2003).
- 5) Watanabe, N. et al.: *J. Oleo Sci.*, **55**, 391 (2006).
- 6) Watanabe, N. et al.: *J. Sci. Food Agr.*, **88**, 2749 (2008).
- 7) Kameda, T. et al.: *Food Sci. Technol. Res.*, **24**, 493 (2018).
- 8) Kameda, T. et al.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **64**, 381 (2018).
- 9) Yang, Y. et al.: *J. Funct. Foods*, **49**, 162 (2018).